

FERMENTED GALENICAL PREPARATION HAVING ANTIOXIDATIVE ACTIVITY

Patent number: JP2003238437
Publication date: 2003-08-27
Inventor: YAMAGUCHI NOBUO; IZUMI HISAKO
Applicant: ISHIKAWA TENNEN YAKKO BUSSHITS; YAMAGUCHI
NOBUO; IZUMI HISAKO; CHLORELLAS SUPPLY KK
Classification:
- **international:** A61P39/06; A61P39/00; (IPC1-7): A61K35/78;
A61P39/06
- **european:**
Application number: JP20020032168 20020208
Priority number(s): JP20020032168 20020208

[Report a data error here](#)

Abstract of JP2003238437

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a fermented galenical preparation that exhibits antioxidative activity, when ingested into a living organism, and does not damage a sterilizing action of cells in the living organism, and to provide a method for producing the same.

SOLUTION: This fermented galenical preparation contains a fermented galenical.

COPYRIGHT: (C)2003,JPO

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-238437

(P2003-238437A)

(43)公開日 平成15年8月27日(2003.8.27)

(51)Int.Cl.⁷

A 61 K 35/78

A 61 P 39/06

識別記号

F I

テマコード(参考)

A 61 K 35/78

W 4 C 0 8 8

A 61 P 39/06

審査請求 有 請求項の数10 O.L (全 8 頁)

(21)出願番号

特願2002-32168(P2002-32168)

(22)出願日

平成14年2月8日(2002.2.8)

(71)出願人 500451388

財団法人 石川天然薬効物質研究センター
石川県金沢市福島町又108

(71)出願人 599006498

山口 宣夫
石川県河北郡内灘町字大清台61番地

(71)出願人 502048313

泉 久子
石川県金沢市福島町又108番地

(74)代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗酸化能を有する発酵生薬製剤

(57)【要約】

【課題】 生体内に摂取された場合に抗酸化能を有し、かつ生体内細胞の殺菌作用は損なわないと評価される発酵生薬製剤及びその製造方法を提供すること。

【解決手段】 発酵させた生薬を含むことを特徴とする発酵生薬製剤。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 発酵させた生薬を含むことを特徴とする発酵生薬製剤。

【請求項2】 抗酸化能を有するものである請求項1記載の製剤。

【請求項3】 抗酸化能が生体内細胞において評価されるものである請求項2記載の製剤。

【請求項4】 生体内細胞において抗酸化能を有し、かつ生体内細胞の殺菌作用は損なわれないと評価されるものである請求項3記載の製剤。

【請求項5】 生体内細胞が貪食細胞である請求項3又は4記載の製剤。

【請求項6】 貪食細胞が、好中球、好酸球、单球、大食細胞、多形核白血球、クッパー細胞、ランゲルハンス細胞及びミクログリア細胞からなる群より選択される少なくとも1つである請求項5記載の製剤。

【請求項7】 抗酸化能が、生体内細胞の酸素スーパー・オキシドジスムターゼ活性を測定することにより評価されるものである請求項3記載の製剤。

【請求項8】 生薬が、十全大補湯、補中益氣湯及び小青竜湯からなる群より選択される少なくとも1つである請求項1～7のいずれか1項に記載の製剤。

【請求項9】 生薬を発酵させることを特徴とする発酵生薬製剤の製造方法。

【請求項10】 生薬が、十全大補湯、補中益氣湯及び小青竜湯からなる群より選択される少なくとも1つである請求項9記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、生体内由来細胞において抗酸化能が評価された発酵生薬製剤及びその製造方法に関する。

【0002】

【従来の製造技術】活性酸素は、生体内細胞、特に大食細胞、好中球等の貪食細胞の細胞質内で産生され、外来性異物の消化分解にとって必須の要素である。しかし、外来性異物の侵入レベルが低い時には、この活性酸素が内在性構成細胞に作用して障害的に働くため、活性酸素の適時適切なレベルの調節が求められる。一方、抗酸化能を有する製剤を、漢方剤及びその残渣物から得ることはリサイクルの徹底上好ましいことであり、その製造方法の開発が望まれていた。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、生体内に摂取された場合に生体内細胞において抗酸化能を有し、かつ生体内細胞の殺菌作用は損なわれないと評価される発酵生薬製剤及びその製造方法を提供することを目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題を

解決するため鋭意研究を行った結果、生薬を発酵し、それをマウスに経口的に摂取させた後にマウスの腹腔内から食細胞を取り出して、その食細胞の活性酸素生成能を測定する方法により上記発酵生薬の抗酸化能を評価したところ、当該発酵生薬が生体内貪食細胞において抗酸化能を示し、かつ殺菌作用には影響を及ぼさないことを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、発酵させた生薬を含むことを特徴とする発酵生薬製剤である。ここで、上記発酵生薬製剤は抗酸化能を有するものであり、また好ましくは生体内細胞の殺菌作用が損なわれないと評価されるものである。

【0005】上記抗酸化能及び殺菌作用は、生体内細胞、特に貪食細胞において評価されるものである。該貪食細胞としては、好中球、好酸球、单球、大食細胞、多形核白血球、クッパー細胞、ランゲルハンス細胞、ミクログリア細胞等が挙げられる。また上記抗酸化能は、生体内細胞の酸素スーパー・オキシドジスムターゼ(SOD)活性を測定することが好ましい。上記発酵生薬製剤の生薬は、限定するものではないが、例えば十全大補湯、補中益氣湯及び小青竜湯などであることが好ましい。さらに本発明は、生薬の発酵を含むことを特徴とする発酵生薬製剤の製造方法である。上記生薬については上述した通りである。

【0006】

【発明の実施の形態】以下、本発明に係る発酵生薬製剤及びその製造方法に関して詳細に説明する。本発明に係る発酵生薬製剤は、発酵させた生薬（以下、「発酵生薬」という）を有効成分として含有するものであり、生体内細胞において抗酸化能を有し、かつ生体内細胞の殺菌作用は損なわれないと特徴とする。

【0007】1. 発酵生薬

本発明において発酵対象の生薬は、限定するものではないが、以下に示すものが挙げられる：

人参(ニンジン)、黄耆(オウギ)、蒼朮(ソウジュツ)、当帰(トウキ)、茯苓(ブクリョウ)、地黄(ジオウ)、川きゅう(センキュウ)、芍藥(シャクヤク)、桂皮(ケイヒ)、甘草(カンゾウ)、半夏(ハンゲ)、五味子(ゴミシ)、細辛(サイシン)、麻黃(マオウ)、乾姜(カンキョウ)、陳皮(チンピ)、大棗(タイソウ)、紫胡(サイコ)、生姜(ショウキョウ)、升麻(ショウマ)、茴香(ウイキョウ)、延胡索(エンゴサク)、黃今(オウゴン)、黃柏(オウバク)、黃連(オウレン)、何首烏(カシュウ)、葛根(カッコン)、桔梗(キキョウ)、菊花(キクカ)、杏仁(キヨウニン)、苦參(クジン)、荊芥(ケイガイ)、紅花(コウカ)、香附子(コウブシ)、梗米(コウベイ)、厚朴(コウボク)、牛膝(ゴシツ)、吳茱萸(ゴシュユ)、牛蒡子(ゴボウシ)、胡麻(ゴマ)、山梔子(サンシシ)、山茱萸(サンシュユ)、山椒(サンショウ)、山藥(サンヤク)、地骨皮(ジコッピ)、柴

根（シコン）、車前子（シャゼンシ）、辛夷（シンイ）、前胡（ゼンコ）、川骨（センコツ）、桑白皮（ソウハクヒ）、蘇木（ソボク）、蘇葉（ソヨウ）、大黃（ダイオウ）、沢瀉（タクシャ）、竹茹（チクジョ）、知母（チモ）、丁子（チヨウジ）、釣藤鈎（チヨウトウコウ）、猪苓（チヨレイ）、天南星（テンナンショウ）、天麻（テンマ）、天門冬（テンモンドウ）、冬瓜子（トウガシ）、桃仁（トウニン）、獨活（ドクカツ）、忍冬（ニンドウ）、貝母（バイモ）、麦芽（バクガ）、麥門冬（バクモンドウ）、薄荷（ハッカ）、浜防風（ハマボウフウ）、百合（ビャクゴウ）、白芷（ビャクシ）、白朮（ビャクジュツ）、枇杷葉（ビワヨウ）、檳榔子（ビンロウジ）、附子（ブシ）、防己（ボウイ）、防風（ボウフウ）、牡丹皮（ボタンピ）、麻子仁（マシニン）、木通（モクツウ）、木香（モッコウ）、意苡仁（ヨクイニン）、竜眼肉（リュウガンニク）、竜胆（リュウタク）、連翹（レンギョウ）、蓮肉（レンニク）

【0008】上記生薬は、天然からそのまま単離した成分であってもよいし、抽出、粉碎、微粉末化又は凍結乾燥などの処理を行った成分であってもよい。上記生薬の抽出物としては、例えば各種の水系溶剤及び有機溶剤抽出物が挙げられるが、特に熱水抽出物が好ましい。具体的な抽出物の調製例としては、上記生薬を水系溶剤又は有機溶剤、例えば熱水で抽出し、得られた抽出液を沪過する方法が挙げられる。この抽出物は必要に応じて凍結乾燥させ、乾燥粉末として用いることができる。なお、上記生薬は、1種類を使用してもよいし、又は複数の生薬を混合した複合生薬として使用してもよい。複合生薬においては、1種類若しくは複数の生薬、又は全ての生薬を、抽出、粉碎、微粉末化したものであってよい。

【0009】上記複合生薬製剤としては、限定するものではないが、以下のものが挙げられる：

十全大補湯、当帰六黄湯、補中益氣湯、葛根湯、葛根湯加川きゅう辛夷、乙字湯、安中散、十味敗毒湯、八味地黄丸、大柴胡湯、小柴胡湯、柴胡桂枝湯、柴胡加竜骨牡蠣湯、半夏瀉心湯、黃連解毒湯、半夏厚朴湯、五苓散、小青竜湯、防己黄耆湯、消風散、當帰芍藥散、加味逍遙散、桂枝茯苓丸、桂枝加竜骨牡蠣湯、麻黃湯、麥門冬湯、四逆散、苓桂朮甘湯、桂枝湯、七物降下湯、荊芥連翹湯、清上防風湯、防風通聖散、女神散、芍藥甘草湯、平胃散、大黃甘草湯、當帰飲子、六味丸、治打撲一方、小建中湯、大建中湯、辛夷清肺湯、牛車腎氣丸、柴芩湯、茯苓飲合半夏厚朴湯、黃連湯、當帰建中湯、桂枝茯苓丸加よく苡仁、麻子仁丸、麻黃附子細辛湯、桂枝加芍藥大黃湯、清暑益氣湯、桔梗湯。

【0010】上記例示した複合生薬は当技術分野で公知であり、複合生薬中に含まれる生薬の種類及び配合量も一般的に知られている（参考文献：漢方治療マニュアル、1996年、六法出版社）。本発明を利用する場合、限定するものではないが、十全大補湯、補中益氣湯及び小

青竜湯等の補剤又は瀉剤が好ましい。本発明の発酵生薬製剤として製造することが好ましい3種の複合生薬（十全大補湯、補中益氣湯及び小青竜湯）は、例えば、以下に示す量の各種の生薬を熱水抽出した後乾燥エキスにし、賦形剤を加えて調製したものである。

【0011】十全大補湯（以下「JTT」と略す）は、人参（ニンジン3.0 g）、黃耆（オウギ3.0 g）、蒼朾（ソウジュツ3.0 g）、當帰（トウキ3.0 g）、茯苓（ブクリヨウ3.0 g）、地黃（ジオウ3.0 g）、川きゅう（センキユウ3.0 g）、芍藥（シャクヤク3.0 g）、桂皮（ケイヒ3.0 g）及び甘草（カンゾウ1.5 g）を含む複合生薬である。

【0012】小青竜湯（以下「SRT」と略す）は、半夏（ハンゲ6.0 g）、甘草（カンゾウ3.0 g）、桂皮（ケイヒ3.0 g）、五味子（ゴミシ3.0 g）、細辛（サイシン3.0 g）、芍藥（シャクヤク3.0 g）、麻黃（マオウ3.0 g）及び乾姜（カンキョウ3.0 g）を含む複合生薬である。

【0013】補中益氣湯（以下「HET」と略す）は、人参（ニンジン4.0 g）、蒼朾（ソウジュツ4.0 g）、黃耆（オウギ4.0 g）、當帰（トウキ3.0 g）、陳皮（チンピ2.0 g）、大棗（タイソウ2.0 g）、紫胡（サイコ2.0 g）、甘草（カンゾウ1.5 g）、生姜（ショウキョウ0.5 g）及び升麻（ショウウマ1.0 g）を含む複合生薬である。上記複合生薬は、例えば（株）ツムラ、（株）カネボウ、（株）栄本天海堂から市販されている。

【0014】上記生薬の発酵生薬の調製は、先ず、原材料（生薬）を纖維分解酵素と混合し、約30～45℃、好ましくは40℃にて、4～10日間、好ましくは5日間静置する。纖維分解酵素としては、セルラーゼ、アミラーゼなどを用いることができる。また原材料と纖維成分分解酵素の混合比率は、重量で約100対5とすることが好ましい。続いて、得られた混合物を溶解液と残渣に分離後、残渣に再度酵素処理を繰り返す。酵素処理は合計2～5回程度行う。その後、酵母菌を主成分とする発酵微生物を添加し、約30～45℃にて、約10～14日間発酵処理を進める。発酵微生物としては、セルロース、デンプン等の糖体を分解する微生物を利用でき、酵母菌の他、限定するものではないが、乳酸菌などが挙げられる。酵母としては、サッカロマイセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）など、乳酸菌としては、ラクトバチルス・アシドフィルス（*Lactobacillus acidophilus*）、ラクトバチルス・キュラタス（*Lactobacillus curratus*）、ラクトバチルス・ファルシミニス（*Lactobacillus farciminis*）などを利用することができる。この際、原材料溶解物と発酵微生物の重量比は、発酵完了時間が変動するものの発酵処理の成否を左右するものではなく、例えば約100対5とすることが好ましい。複合生薬（例えばJTT、SRT及びHET）の発酵生薬は、複数の生薬混合物のうち、1種類若しくは複数の生薬又は全ての生薬を適宜組み合わせて発酵させたものとすることが

できる。

【0015】2. 発酵生薬の抗酸化能

上述のようにして製造された発酵生薬は、生体内においてその抗酸化能が評価される。本発明において「抗酸化能」とは、活性酸素又は酸化物質の作用を消去又は低減させる能力を指す。この活性酸素は、強い殺菌作用を示すことが知られており、活性酸素としては、例えば $\cdot\text{O}_2^-$ （スーパー・オキシドアニオン）、 H_2O_2 （過酸化水素）、 $\cdot\text{OH}$ （ヒドロキシラジカル）、 $^1\text{O}_2$ （一重項酸素）、 NO_x （窒素酸化物）などがある。活性酸素は、生体防御、特に貧食細胞が関与する防御に必須なものであるが、それが過剰に產生されると、生体の正常な細胞に対して有害な影響を与えることが示されている。また NO_x は、不安定なラジカルであり、スーパー・オキシドと速やかに反応して、スーパー・オキシナイトライト(ONOO^-)を形成し、その結果、血管内皮由来弛緩因子の弛緩作用が失われることなどが知られている。そのため、現在では、生体内の活性酸素量を低減するための食品及び薬品、すなわち抗酸化食品及び抗酸化剤に関する研究が多く行われている。本発明は、そのような抗酸化能を有する発酵生薬を提供するものである。

【0016】本発明者は、発酵生薬の抗酸化能を評価するために、生体内細胞を利用して抗酸化能の評価を試みた。該評価方法において、生体内細胞としては、貪食細胞が挙げられ、貪食細胞には、限定するものではないが、好中球、好酸球、単球、大食細胞、多形核白血球、クッパー細胞、ランゲルハンス細胞、ミクログリア細胞などが含まれる。貪食細胞は、食細胞とも呼ばれ、生体防御機能を有する細胞であり、細菌、真菌、老化した自己赤血球、死んだ組織細胞、異物などの貪食を主に行う。その貪食の際に、貪食細胞は、活性酸素を產生して、捕捉した異物などを破壊することが知られている。

【0017】本発明者は、上記評価方法において、生体内細胞、特に貪食細胞の產生する活性酸素量に対して、生体内に摂取された発酵生薬が及ぼす影響を測定した。上記評価方法は、例えば以下のステップを含むものである。

(a) 発酵生薬を試験動物に投与するステップ、(b) 上記試験動物から生体内細胞を採取するステップ、及び(c) 採取した生体内細胞の活性酸素量を測定するステップ。上記ステップ(a)は、発酵生薬を試験動物に投与するステップである。当該試験動物としては、哺乳動物を利用できることが可能で、例えばラット、マウス、ウサギなどが挙げられる。

【0018】発酵生薬を試験動物に投与する場合、その投与経路、投与量、投与間隔などは、その発酵生薬の性質、試験動物の種類などに応じて任意に変更することができる。投与経路は、経口投与であってもよいし、静脈内、筋内、皮下、腹腔内投与などの非経口投与であってもよい。発酵生薬を評価する場合には、発酵生薬を経口

投与することが好ましい。

【0019】上記ステップ(b)は、ステップ(a)で発酵生薬を投与した試験動物から生体内細胞を採取するステップである。生体内細胞の採取には、当技術分野で一般的ないずれの手法も用いることができる。例えば、好中球を採取するには、オイスター・グリコーゲンなどの刺激剤を上記試験動物の腹腔内に投与することによって、該試験動物の腹腔内に好中球が滲出するため、それを採取すればよい。

【0020】生体内細胞として例えば肝クッパー細胞を採取するには、上記試験動物から無菌的に肝臓を採取し、RPMI1640などの培地の中で肝組織をハサミで細かく切断し、ナイロンメッシュを通して大きな細胞塊を取り除くことにより採取することができる。

【0021】また、ランゲルハンス細胞を採取するには、上記試験動物から無菌的に上皮組織を採取し、上皮組織をハサミで細かく切断し、RPMI1640などの培地を入れたカルチャーディッシュに移し、ピンセットでほぐした後、針をつけたシリング内に出し入れして細胞塊を細かくほぐし、ナイロンメッシュを通して大きな細胞塊を取り除くことにより採取することができる。

【0022】さらに脾マクロファージを採取するには、上記試験動物から無菌的に脾臓を採取し、脾臓をハサミで細かく切断し、RPMI1640などの培地を入れたカルチャーディッシュに移し、ピンセットでほぐした後、細胞を含む培養液を針をつけたシリング内に出し入れして細胞塊を細かくほぐし、ナイロンメッシュを通して大きな細胞塊を取り除くことにより採取することができる。

【0023】採取した生体内細胞は、当技術分野で公知の任意のバッファー中に懸濁して細胞浮遊液を調製する。上記評価方法において好ましいバッファーとしては、限定するものではないが、HEPESバッファー(17mM HEPES, 120mM NaCl, 5mM Glucose, 5mM KCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂)、PBSなどが挙げられる。ステップ(c)は、採取した生体内細胞の活性酸素量を測定するステップである。

【0024】活性酸素量の測定は、当技術分野で公知の活性酸素測定方法であればいずれの方法も採用することができる。例えば、 $\cdot\text{O}_2^-$ の測定方法として、チトクロームc法及びNBT(ニトロブルーテトラゾリウム)法、 $\cdot\text{OH}$ の測定方法として、p-ニトロソジメチルアニリン法及びメチオナール法、 $^1\text{O}_2$ の測定方法として、フラン誘導体法及びコレステロール法などが知られている。具体的に説明すると、上記チトクロームc法は、細胞外に放出された $\cdot\text{O}_2^-$ が不安定な状態にあり、外液中に酸化型チトクロームcが存在すれば即座に O_2 に還元されるという性質を利用して、酸化型チトクロームcが $\cdot\text{O}_2^-$ を還元して酸化型から変化した還元型チトクロームcの量を測定することにより、間接的に $\cdot\text{O}_2^-$ 量を測定するものである。

【0025】ここで、還元型チトクロームcが550nmの可視光線に対して吸光を有することから、チトクロームcを加えた生体内細胞浮遊液の550nmでの吸光度を測定し、以下の式により産出された・O₂⁻を測定する。なお、19.1×10³は還元型チトクロームcの550nmでのモル吸光係数を示す。

【0026】産出された・O₂⁻量 (mmol/ml) = 550nmにおける吸光度の上昇 ($\Delta_{4550-540\text{nm}}$) / 19.1×10³
具体的に説明すると、試験動物から調製した生体内細胞浮遊液にチトクロームcを添加して、その混合液の上清の吸光度を550nm及び540nmにて測定し、得られた結果を上記式に当てはめて産出された・O₂⁻量を求める。

【0027】またNBT（ニトロブルーテトラゾリウム）法は、NBTが・O₂⁻により還元されて水不溶性の青色のホルマザンを生じることを利用したものである。具体的に説明すると、上記試験動物から調製した生体内細胞浮遊液をカバーガラス上にとり、約37°Cに保温しておいた温潤室（湿ったガーゼを敷いたペトリ皿）に入れて約37°Cにて約25分間放置した後、カバーガラスを取り出し、生理的食塩水で凝血塊を洗い流す。カバーガラスの一辺をろ紙にあてて生理的食塩水をよく取り除き、NBT溶液1滴をのせたスライドガラス上に、カバーガラスを細胞が付着した面を下にしてかぶせ、温潤室に入れて約37°Cにて約20分間放置する。その後、カバーガラスを取り出して乾燥させ、メタノールで1分間固定し、水洗する。続いて、1%サフラニン液につけて約5分間放置した後、水洗及び乾燥させると、ホルマザンを含む陽性細胞は膨潤し、細胞質全体が青黒く慢性に着色して、核網が不明瞭になる。細胞100～300個を観察し、陽性率を算出する。その他のp-ニトロソジメチルアニリン法、メチオナール法、フラン誘導体法及びコレステロール法は当技術分野で公知であり、文献などに記載の方法に従って各活性酸素量を測定することが可能である。

【0028】上記評価方法においては、上記ステップ(b)で採取された生体内細胞に対し、活性酸素量を測定する前に、さらに活性酸素の産生を誘導するステップを行ってもよい。活性酸素産生の誘導は、例えば活性酸素産生誘導刺激剤を用いることにより行う。かかる活性酸素産生誘導刺激剤としては、限定するものではないが、ホルボルミリストアセテート(PMA；・O₂⁻産出誘導刺激剤)、細菌性リポポリサッカライド(LPS；NO_x産出誘導刺激剤)が挙げられる。活性酸素産生誘導刺激剤は、用いる刺激剤の種類、試験動物の種類、誘導させる活性酸素量などを考慮して、任意の量及び濃度で生体内細胞と混合する。例えば、10⁻⁶M PMAを用いる場合には、生体由来の食細胞1,000,000～2,000,000個当たりPM A5～10μlを添加し、活性酸素量の測定に供する。

【0029】抗酸化能は、未処理対照群の活性酸素量と相対的に比較した場合に、評価対象である発酵生薬の活性酸素量が有意差を有して低減していれば当該発酵生薬

が抗酸化能を有するものとする。上記評価方法により、本発明に係る発酵生薬は抗酸化能を有することが示された。

【0030】さらに、上記評価方法においては、上記ステップ(c)と併行して、発酵生薬が生体内細胞の殺菌作用に及ぼす影響を測定するステップをさらに行ってもよい。このステップは、採取した生体内細胞に微生物を取り込ませ、該生体内細胞が殺菌した微生物の量を測定することにより行う。このステップにより、発酵生薬の抗酸化能によって、生体内細胞が本来有する殺菌作用が損なわれないかどうかを評価することができる。上記評価方法において利用可能な微生物は、生体内細胞によって殺菌又は貪食されるものであれば特に限定されず、例えば細菌、放線菌などの原核生物、菌類、原虫などの真核生物が挙げられる。

【0031】上記ステップでは、最初に、採取した生体内細胞に微生物を添加し、培養することにより、生体内細胞に微生物を取り込ませる。生体内細胞に添加する微生物の量は、細胞1,000,000～10,000,000個当たり微生物10,000,000～50,000,000である。培養に使用する培養液としては、限定するものではないが、ハンクス平衡塩類溶液などが挙げられる。また培養温度は、30～37°C、好ましくは37°Cである。培養時間は、生体内細胞の10～30%が細胞1個当たり約5～15以上の微生物をその細胞質内に貪食しているかどうかを基準として決定する。細胞質内の微生物数は、例えば顕微鏡下で観察することにより計数することができる。例えば限定するものではないが、微生物として真菌類を用いる場合には、生体内細胞の90%以上が5以上の大腸菌を細胞質内に貪食していれば培養を終了してよい。

【0032】続いて、培養液中の過剰な微生物を、例えばフラッシングして除去する。次いで、さらに60～120時間培養する。この際、必要であれば培養前に新たな培養液を1～3ml程度添加してもよい。培養終了後、生体内細胞の細胞質内に貪食された微生物の数が、上述の培養時間の決定において基準とした微生物数（すなわち約5～15個）の約0～50%以下に減少している場合に、その細胞を殺菌能力陽性細胞と判定する。例えば微生物として真菌類を用いる場合には、基準となる5以上の真菌類の40%に相当する2以下に減少している場合には、その細胞を殺菌能力陽性細胞と判定することができる。

【0033】評価した生体内細胞のうち10～15%以上が殺菌能力陽性細胞と判定された場合には、評価対象の発酵生薬は、生体内細胞の殺菌作用を有意に低減するものではないと評価する。上記評価方法により、本発明に係る発酵生薬は、生体内細胞の殺菌作用を有意に損なわないものであると評価された。

【0034】本発明者は、上述の評価方法に従って、本発明に係る発酵生薬の生体内における抗酸化能を確認した。従って、本発明に係る発酵生薬は、生体内において

抗酸化能を有し、かつ生体内細胞が元来有する殺菌作用を有意に損なうものではなく、さらに、安全性が高く、また加熱などの加工手段を加えてもその効果は失われることなく安定であるため、様々な用途に有用である。

【0035】3. 発酵生薬製剤

上述のように製造された発酵生薬は、抗酸化能を有することが評価されるため、発酵生薬製剤として医薬組成物及び食品・化粧品などに利用することができる。発酵生薬を有効成分として含む医薬組成物、すなわち発酵生薬製剤は、医薬的に許容される担体又は添加物と共に含むものであってもよい。このような担体及び添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターーチナトリウム、ペクチン、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤などの他、リポゾームなどの人工細胞構造物などが挙げられる。使用される添加物は、医薬組成物の剤形に応じて上記の中から適宜又は組み合わせて選択される。

【0036】本発明に係る発酵生薬製剤は、経口的又は非経口的に投与することができる。上記発酵生薬製剤を経口的に投与する場合は、錠剤、顆粒剤、散剤、丸剤などの固形製剤、あるいは液剤、懸濁剤、シロップ剤などの液体製剤等として発酵生薬を製剤化すればよい。特に顆粒剤及び散剤は、カプセル剤として単位投与剤形としてもよいし、また液体製剤の場合には使用する際に再溶解させる乾燥生成物にしてもよい。

【0037】上記剤形のうち経口用固形製剤は、通常それらの組成物中に薬学上一般に使用される結合剤、賦形剤、滑沢剤、崩壊剤、潤滑剤などの添加剤を含有する。また、経口用液体製剤は、通常それらの組成物中に薬学上一般に使用される安定剤、緩衝剤、矯味剤、保存剤、芳香剤、着色剤などの添加剤を含有する。

【0038】本発明の発酵生薬製剤を非経口的に投与する場合は、注射剤又は坐剤等とすることができる。例えば注射剤は、発酵生薬を溶液、懸濁液、乳液などに溶解又は懸濁して調製されるものであり、通常単位投与量アンプル又は多投与量容器の形態で提供される。また注射剤は、使用する際に適当な担体、例えば発熱物質不含の滅菌水に再溶解させる粉剤であってもよい。注射手法としては、例えば点滴静脈内注射、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射、皮内注射が挙げられる。これらの非経口投与剤形は、通常それらの組成物中に薬学上一般的に使用される乳化剤、懸濁剤などの添加剤を含有する。

【0039】上記発酵生薬製剤に配合する発酵生薬量は、使用する生薬の種類などにより異なるが、例えば、総重量を基準として30～5重量%、好ましくは15～10重量%である。また、その投与量は、投与対象の年齢及び体重、投与経路、投与回数により異なり、広範囲に変更することができる。例えば、発酵生薬の有効量と適切な希釈剤及び薬学的に使用しうる担体との組み合わせとして投与される有効量は、経口的に投与する場合には、1日につき体重1kg当たり1000～200mgであり、1日から3日の間隔で投与される。

【0040】本発明に係る発酵生薬製剤を投与する対象としては、限定するものではないが、ヒト、家畜、愛玩動物、実験動物でありうる。発酵生薬製剤を有効成分として含有する医薬組成物は、その抗酸化能によって、免疫能調節剤、循環器系機能改善剤、動脈硬化阻止のために投与することができる。

【0041】また本発明に係る発酵生薬製剤は、医薬組成物としての用途に限定されず、その他、例えば食品、飼料又は化粧品等に配合されてもよい。従って、発酵生薬が配合された食品及び飼料は、抗酸化作用を誘導するための健康補助製品として有用である。また発酵生薬が配合された化粧品は、その抗酸化能のため、色素沈着阻止・軽減剤として有用である。

【0042】発酵生薬を配合する食品としては、米飯類、菓子類、麵類、カマボコ・チクワ等の水産練り製品、ハム・ソーセージ等の畜肉加工品、清涼飲料・果実飲料等の飲料類、マヨネーズ・ドレッシング・味付け調味液等の調味料等が挙げられるが、これらに限定されない。これらの食品には、通常の食品に使用される着色料、香料、甘味料、酸味料等を適宜配合してもよい。食品に配合する発酵生薬の量は、例えば1000～100g/kgであり、好ましくは50g/kgである。

【0043】発酵生薬を配合する飼料としては、家畜・家禽・魚類用の粉状、練り製品状又はペレット状の飼料等が挙げられるが、これらに限定されない。これらの飼料には、通常の飼料に使用される着色料、香料等を適宜配合してもよい。飼料に配合する発酵生薬の量は、例えば2000～200g/kgであり、好ましくは50g/kgである。

【0044】また、発酵生薬を配合する化粧品としては、例えば、化粧水、乳液、クリーム、ファンデーション等を挙げることができる。これらの化粧品には、通常の化粧品に使用される界面活性剤、保湿剤、美白剤、紫外線吸収剤、香料、防腐剤等を適宜配合してもよい。化粧品に配合する発酵生薬の量は、例えば200～2g/lであり、好ましくは5g/lである。本発明に係る発酵生薬は、抗酸化剤として有用であり、また、その生体内における抗酸化作用によって、病気の予防・悪化防止、老化防止、健康維持に有効である。

【0045】

【実施例】以下、実施例により本発明で製造法が示され

た発酵製剤の抗酸化能をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。

【0046】〔実施例1〕発酵生薬製剤の製造

十全大補湯 (JTT) は、人参 (ニンジン3.0 g) 、黄耆 (オウギ3.0 g) 、蒼朮 (ソウジュツ3.0 g) 、当帰 (トウキ3.0 g) 、茯苓 (ブクリョウ3.0 g) 、地黃 (ジオウ3.0 g) 、川きゅう (センキュウ3.0 g) 、芍藥 (シャクヤク3.0 g) 、桂皮 (ケイヒ3.0 g) 及び甘草 (カンゾウ1.5 g) からなる複合生薬を熱水抽出した後、乾燥エキスにした。

【0047】小青竜湯 (SRT) は、半夏 (ハンゲ6.0 g) 、甘草 (カンゾウ3.0 g) 、桂皮 (ケイヒ3.0 g) 、五味子 (ゴミシ3.0 g) 、細辛 (サイシン3.0 g) 、芍藥 (シャクヤク3.0 g) 、麻黄 (マオウ3.0 g) 及び乾姜 (カンキョウ3.0 g) からなる複合生薬を熱水抽出した後、乾燥エキスにした。

【0048】補中益氣湯 (HET) は、人参 (ニンジン4.0 g) 、蒼朮 (ソウジュツ4.0 g) 、黄耆 (オウギ4.0 g) 、当帰 (トウキ3.0 g) 、陳皮 (チンピ2.0 g) 、大棗 (タイソウ2.0 g) 、紫胡 (サイコ2.0 g) 、甘草 (カンゾウ1.5 g) 、生姜 (ショウキョウ0.5 g) 及び升麻 (ショウウマ1.0g) からなる複合生薬を熱水抽出した後、乾燥エキスにした。

【0049】上記3種の複合生薬をそれぞれ独自に分別し、複合生薬とセルラーゼ (和光純薬、東京) を重量比100対5で混合し、40°Cにて5日間孵置した。続いて、得られた混合物を溶解液と残渣に分離し、残渣をさらに3回セルラーゼ処理した。次に、発酵菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) を添加し (重量比100対5) 、40°Cにて7日間孵置して発酵した。

【0050】〔実施例2〕好中球を利用することによる発酵生薬製剤の抗酸化能の評価

実施例1で調製した発酵生薬製剤の抗酸化能について評価するため、以下の実験を行った。

(1) 被検薬

実施例1で調製した十全大補湯、補中益氣湯、小青竜湯、及び各々の発酵物を10mg/0.2ml蒸留水となるように調製した。

(2) 試薬

細胞浮遊液を調製するためのHEPESバッファー (17mM HEPES, 120mM NaCl, 5mM Glucose, 5mM KCl, 1mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂) は、沪過滅菌したものを用いた。O₂⁻産出誘導刺激剤としては、PMA (Sigma社製) をDMSOで10⁻⁶Mとなるように調製したものを用いた。還元剤としては、フェリチトクローム-C (cyt-C, Sigma社製) をHEPESバッファーで1mMとなるように調製したものを用いた。マウス腹腔内へ好中球を滲出させるための刺激剤としては、オイスターーグリコーゲン10 w/v%水溶液を120°Cで20分

オートクレーブ滅菌したものを用いた。

【0052】(3) 産出された活性酸素量の測定

好中球を利用する好酸化能力の評価方法を確立するため以下の実験を行った。マウス (C57BL/6NCrj) に上記 (1) で調製した被検薬0.2mlを経口投与した。投与の24時間後に、グリコーゲンオイスター水溶液2mlを腹腔内注射した。その後6時間後、頸椎脱臼して安樂死させたマウスより腹腔滲出細胞を回収し、1500rpm、4°Cで5分間遠心して2回洗浄した。HEPESバッファー中に1×10⁶細胞/mlとなるように細胞浮遊液を調製した後、cyt-C 100μl及びPMA 10μlを加えて37°Cの恒温槽にて軽く振盪させながら20分間培養した。培養後直ちに氷中につけて反応を停止させ、1500rpm、4°Cで10分間遠心した。上清の吸光度を550nm及び540nmにて測定し、生成された活性酸素量を算出した。活性酸素量の測定は、オイスターーグリコーゲンによる刺激から6時間後に行った。

【0053】JTT、HET、SRT、及びその発酵物を投与した場合において、マウスの腹腔滲出好中球により産出された活性酸素量を図1に示す。産出された活性酸素量は、JTT及びその発酵物、HET及びその発酵物、並びにSRT及びその発酵物を投与した場合に、それぞれ1.24及び0.62 (×10⁻⁵mmol) 、1.25及び0.84 (×10⁻⁵mmol) 、並びに3.44及び1.40 (×10⁻⁵mmol) であった。これに対して対照では2.85 (×10⁻⁵mmol) であった。上記3種の発酵生薬製剤全てについて、発酵物投与の場合には、非発酵物と比較して、活性酸素の産出が減少することが確認された。

【0054】〔実施例3〕食細胞を利用することによる発酵生薬製剤の殺菌作用に対する影響の評価

食細胞を利用して発酵生薬製剤が殺菌作用に及ぼす影響を評価するため以下の実験を行った。マウス (C57BL/6NCrj) に上記 (1) で調製した被検薬0.2mlを1日置きに5回経口投与した。最終投与の24時間後に、グリコーゲンオイスター水溶液2mlを腹腔内注射した。その後6時間後に、頸椎脱臼して安樂死させたマウスより腹腔滲出細胞を回収し、1500rpm、4°Cで5分間遠心して2回洗浄した。その後ペトリ皿にて、90分培養 (ハンクス平衡塩類溶液+FCS中、37°C) し、皿底に非付着性の細胞を除き、3回フラッシングしてから、真菌の1種であるカンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*; 1,000,000/ml) 0.25mlを添加し、更に90分培養した。この時点において、食細胞の97%は5個以上の真菌を細胞質内に貪食していた。その後、余剰の真菌をフラッシングしながら除き、新たな培養液 (1ml) を加えて、6時間培養した。培養終了後、顕微鏡下でペトリ皿底の20視野を数え、細胞質内に真菌が2個以下の細胞を殺菌能力陽性細胞とした。この結果を表1に示す。

【0055】

【表1】

被評価サンプル	殺菌能力陽性細胞数(%)
対照群	27.1
JTT	36.5
JTT 発酵	41.5
HET	33.4
HET 発酵	34.8
SRT	38.9
SRT 発酵	40.6

【0056】表1の結果より、JTT、HET及びSRTの各発酵生薬製剤は、対照群及び非発酵製剤と比較して、生体内細胞の殺菌作用を損なうものではないことがわかる。

【0057】

【発明の効果】本発明により、生体内細胞において抗酸化能が評価された発酵生薬製剤及びその製造方法が提供される。本発明において開発された発酵生薬製剤は、抗酸化能を有するため、医薬品、食品及び化粧品に配合し

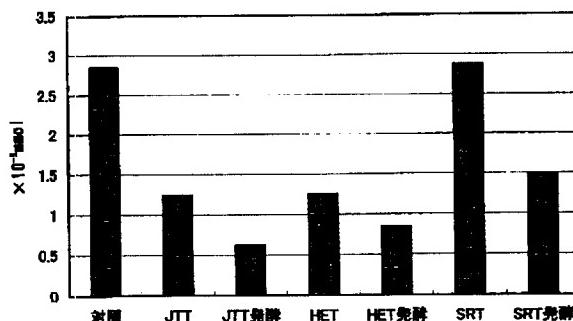
て利用するのに有用である。また本発明に係る製造方法により、漢方剤やその残渣物から抗酸化能を有する製剤を製造することが可能である。

【0058】

【図面の簡単な説明】

【図1】JTT、HET、SRT及びそれらの発酵物を投与した場合に産出された活性酸素量を示す。

【図1】



フロントページの続き

(71)出願人 500072633

株式会社 クロレラサプライ
島根県出雲市長浜町1372-17

(72)発明者 山口 宣夫

石川県河北郡内灘町大清台61番地

(72)発明者 泉 久子

石川県金沢市福昌町2108番地
Fターム(参考) 4C088 AA04 AB04 AB12 AB32 AB37
AB40 AB59 AB60 AB62 AB80
CA25 MA07 NA14 ZC21